

Restriktion von DNA

Geräte:

sterile Kunststoff-Schnappdeckelphiolen, Styroporblock mit Bohrungen, Eisbad, Mikroliterpipette, Pipettenspitzen für Mikroliterpipette, Heizbad, Thermometer

Chemikalien:

Restriktionsenzym (z.B. EcoRV)

DNA

Pufferlösung

Weiteres wie benötigt (einige Restriktionsenzyme brauchen ATP, andere brauchen Cofaktoren. EcoRV braucht beispielsweise BSA (bovine serum albumin), um vernünftig zu funktionieren)

Hinweis:

Die angegebenen Mengenverhältnisse und Temperaturen müssen unbedingt eingehalten werden!

Durchführung:

Man arbeitet in Schnappdeckelphiolen, die man in die Bohrungen eines Styroporblocks steckt und den Block so auf einem Eisbad schwimmen lässt, dass der Boden der Phiolen mindestens 5 mm tief in das Eisbad eintaucht. 10 U Restriktionsenzym werden mit 50 µl Puffer und 20 µl BSA-Lösung (500 U/ml) versetzt. Nun gibt man 1 µg DNA hinzu. Hierbei ist bei genomischer DNA zu beachten, dass spezielle Pipettenspitzen mit weiten Öffnungen verwendet werden, um die DNA nicht zu beschädigen.

Nun erhitzt man im Wasserbad zwei Stunden lang auf 36°C und denaturiert dann 20 Minuten lang bei 80°C. Die so erhaltene Lösung kann direkt für PCR verwendet werden.

Entsorgung:

Reste können in das Abwasser gegeben werden.

Erklärung:

Das Restriktionsenzym bindet sich an die DNA und "läuft" an ihr entlang, bis es die Basensequenz antrifft, die es "schneidet". Diese Sequenzen sind stets palindromisch (bezogen auf den Komplementärstrang), bei EcoRV z.B. ist die Sequenz

5' GAT|ATC 3'
3' CTA|TAG 5'

wobei der "Einschnitt" an der markierten Stelle erfolgt. Dort wird die Phosphodiester-Bindung hydrolysiert und der DNA-Strang so "zerschnitten". EcoRV erzeugt "blunt ends", d.h. es bleibt kein einzelsträngiger "Rest", während z.B. bei EcoRI quasi 3 bp ssDNA von den Schnittstellen überstehen ("sticky ends").

Bilder:



DNA-Proben von mir, dg7acg und extremchemiker im Eisbad, versetzt mit EcoRV-Restriktionsenzym und bovine serum albumin als Cofaktor



Erhitzen der Restriktionsansätze auf 36°C für 2 h, gefolgt von thermischer Inaktivierung des EcoRV bei 80°C für 20 min